



Title	Sialylation shapes mucus architecture reinforcing barrier function in the colon
Author(s)	谷口, 夢顯
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/92029
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	谷口 夢顯
論文題名 Title	Sialylation shapes mucus architecture reinforcing barrier function in the colon (ムチンのシアリル化は粘液構造を決定し大腸のバリア機能を強化する)
論文内容の要旨 〔目的(Purpose)〕 夥しい数の腸内細菌が生息する消化管には、腸内細菌の侵入を防止するメカニズムの一つとして、Mucin (ムチン) という糖タンパクのネットワーク構造により構成される粘液によるバリア機能が備わっている。腸粘液の主要な構成分子である分泌型ムチンのMucin 2 (Muc2) は高度に糖鎖修飾されたタンパク質であり、そのバリア機能には付加される糖鎖が不可欠であることが明らかとなっている。近年、糖鎖修飾の一種であるシアリル化 (シアル酸の付加) が腸内細菌によるMuc2の分解を防ぐために重要であることが報告されたが、Muc2がいかに細菌侵入を防止するためのネットワーク構造を構築しているかについての分子機構の詳細は不明である。本研究では、大腸Muc2のバリア機能に寄与する新規の糖転移酵素遺伝子を探索し、それらの糖転移酵素によって付与される糖鎖修飾が、どのようなメカニズムでMuc2の機能やネットワーク構造に寄与しているかを明らかにした。 〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕 はじめに大腸Muc2にどのような糖鎖が付加されているかを探索するために、RNA-seqによりマウス腸管上皮細胞における糖転移酵素遺伝子の発現を解析した。その結果、B3gal t5というガラクトース転移酵素とSt6galnac6というシアル酸転移酵素が大腸特異的に高発現していることが明らかになった。これらの糖転移酵素は、Lewis A構造にシアル酸が2つ付加されたDisialyl Lewis A (dSLe^a) 糖鎖構造の生合成に関わることが報告されているため、マウスおよびヒト大腸粘液にdSLe^aが存在するかを、抗dSLe^a抗体を用いた免疫染色で解析した。その結果、dSLe^aのシグナルがマウスおよびヒトの大腸の粘液および杯細胞で観察された。次にB3gal t5及びSt6galnac6のノックアウト (KO) マウスを作製し、両KOマウスの表現型解析を行った。両KOマウスの大腸の抗dSLe^a抗体を用いた免疫染色では、野生型マウスで観察された大腸杯細胞および粘液におけるdSLe^aがほとんど観察されず、更に両KOマウスの大腸Muc2の糖鎖解析を、質量分析を用いて行ったところ、それぞれのKOマウスでdSLe^a構造から脱シアリル化した糖鎖構造が検出された。続いて、この脱シアリル化が大腸粘液層のバリア機能にどのような影響を与えるかを解析したところ、両KOマウスの大腸では、粘液層の厚みが減少し、大腸組織への腸内細菌の侵入が観察され、それとともに大腸粘膜固有層の免疫応答が亢進し、さらに両KOマウスはデキストラン硫酸ナトリウム誘発性大腸炎に対して高感受性になることが明らかとなった。以上の結果から、B3gal t5とSt6galnac6によるMuc2のシアリル化は、Muc2によって形成される粘液層のバリア機能維持に必須であることが明らかとなった。 次に、Muc2糖鎖のシアリル化が大腸粘液層の物性やネットワーク構造にどのように寄与するかを解析した。まず野生型マウスならびに両KOマウスから大腸Muc2を精製し、膜電気泳動法によって脱シアリル化によるMuc2分子の電荷への影響を解析したところ、両KOマウス由来のMuc2は陽極側への泳動度が減少しており、脱シアリル化により陰性電荷が減少している事が示唆された。次に粘液層の弾力性を原子間力顕微鏡で評価した結果、両KOマウスでは粘液層が硬くなり、潤滑性が低下していた。最後に大腸の粘膜表面を走査型電子顕微鏡で観察した結果、野生型マウスの粘液層ではMuc2による多方向性のネットワーク構造が形成され、細菌の侵入を防いでいる像が観察される一方で、両KOマウスではそのネットワーク構造が特定の方向に配向し、細菌が配向性のあるMuc2ポリマーの間から侵入している像が観察された。これらの結果から、B3gal t5とSt6galnac6という二つの糖転移酵素によるMuc2分子のシアリル化は、腸内細菌の侵入を防止するためのMuc2ポリマーによる多方向性のネットワーク構造の構築に不可欠であることが示された。 〔総 括(Conclusion)〕 本研究では、シアル酸を含むdSLe^a糖鎖構造の生合成に関わる糖転移酵素St6galnac6及びB3gal t5に着目した。これまでの報告からシアル酸は陰性電荷を有し親水性を供与する事がわかっている。本研究により、両糖転移酵素によるMuc2のシアリル化によって、Muc2分子の親水性が向上し、それによって粘液層の潤滑性やネットワーク構造が維持され、大腸粘液層のバリア機能が維持されるメカニズムが明らかとなった。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 谷口 夢顯				
論文審査担当者	(職)		氏 名	
	主 査	大阪大学教授	熊 御 淳	イ 名
	副 査	大阪大学教授	藤 井 子	イ 名
	副 査	大阪大学教授	岸 山 通毅	イ 名

論文審査の結果の要旨

膨大な腸内細菌が生息する腸管には、その侵入を防ぐため、ムチンのネットワーク構造により構成される粘液によるバリア機能が備わっている。ムチンに対する糖鎖修飾はこのバリア機能の形成に重要であるが、ムチンがどのようにネットワーク構造を構築しているかについては解明されていない。本学位論文では、シアル酸を含むジシアリル化糖鎖構造の生合成に関わる糖転移酵素St6galnac6及びB3gal t5に着目した。これら酵素のノックアウトマウスでは大腸粘液からジシアリル化糖鎖構造が失われ、粘液の陰性荷電が低下し、ムチンのネットワーク構造が乱れていた。更に粘液層が薄くなり、大腸組織への腸内細菌の侵入が認められ、大腸炎モデルの病態が悪化した。このように、陰性電荷を有するシアル酸がムチンに親水性を与える事でネットワーク構造の構築を促進し、腸バリア機能に寄与するというメカニズムを明らかにした。本成果は学術的意義が極めて高く、学位に値するものと認める。